

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2019.14.006
文章编号: 1005-8982 (2019) 14-0031-05

早期动脉粥样硬化患者的血清代谢组学研究*

吕晓鹏¹, 张泽群¹, 王春梅²

(1. 长春市人民医院 康复医学科, 吉林 长春 130051; 2. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013)

摘要: 目的 采用基于液相色谱-质谱联用技术的代谢组学方法, 探讨早期动脉粥样硬化(AS)患者的血清生物标志物, 为AS的发生机制和早期诊断提供依据。**方法** 运用基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术对24例健康志愿者(对照组)和27例AS患者(AS组)的血清样本进行代谢组学分析。采用正交偏最小二乘法判别分析方法对所得数据进行模式识别, 分析两组代谢谱差异, 筛选并鉴定两组差异代谢产物。**结果** 血清样本中共鉴定分析6个差异代谢产物, 其中AS患者血清中甜菜碱含量升高($P < 0.05$), 而磷脂酰胆碱等5个代谢产物的水平降低($P < 0.05$)。**结论** AS发生早期, 机体氨基酸代谢、脂肪酸代谢及三羧酸循环等代谢通路发生改变, 所鉴定代谢产物有望成为AS早期筛查指标。

关键词: 动脉粥样硬化; 代谢组; 色谱法, 液相; 生物学标记

中图分类号: R540.4

文献标识码: A

Serum metabolomics investigation of patients with early atherosclerosis*

Xiao-peng Lü¹, Ze-qun Zhang¹, Chun-mei Wang²

(1. Department Rehabilitation Medicine, Changchun People's Hospital, Changchun, Jilin 130051, China;
2. College of Pharmacy, Beihua University, Jilin, Jilin 132013, China)

Abstract: Objective To investigate the serum metabolic profiles of early atherosclerosis in patients by LC-MS-based method to provide the basis for early diagnosis. **Methods** Ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry was applied to process the serum samples of 24 healthy volunteers and 27 atherosclerosis patients. Orthogonal to partial squares discriminant analysis was carried out for pattern recognition and characteristic metabolites identification between the two groups. **Results** There were 6 biomarkers identified after multivariate statistical analysis. The level of betaine was increased and 5 biomarkers such as phosphatidylcholine were decreased in the serum of atherosclerosis patients ($P < 0.05$). **Conclusions** Based on the analysis of metabolic pathways, amino acid metabolism, fatty acid metabolism and tricarboxylic acid cycle in atherosclerosis patients are disordered. These 6 different biomarkers can be helpful for the early diagnosing of atherosclerosis.

Keywords: atherosclerosis; metabolomics; chromatography, liquid; biomarkers

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是脂质代谢紊乱造成的血管病变, 为大多数心脑血管疾病的共同病理基础^[1]。冠状动脉造影和动脉波传导速度虽然可

作为有效的检测方法, 但是由于价格昂贵、步骤繁琐及造成创伤等原因难以大范围应用^[2]。代谢组学技术已成为众多疾病早期诊断的重要依据^[3-4]。本研究运

收稿日期: 2019-01-2

* 基金项目: 吉林省科技发展计划(No: 20140311052YY)

[通信作者] 王春梅, E-mail: m15584096680@163.com

用基于超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱技术的代谢组学方法寻找潜在的生物标志物,为 AS 早期临床诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、甲酸(色谱纯,美国 TEDIA 试剂公司),超纯水由 Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司)制备。

1.2 仪器与设备

VaSera VS-1000 无创动脉血管弹性测定仪(日本福田公司),Waters Acquity 超高效液相色谱系统(美国 Waters 公司),Q-TOF SYNAPT G2 HDMS 质谱仪(美国 Waters 公司,配有 ESI 离子源)。

1.3 方法

1.3.1 样本收集 选取 2016 年 3 月—2017 年 6 月长春市人民医院收治的 24 例健康志愿者(对照组)和 27 例 AS 患者(AS 组),血液样本由本院心内科和体检中心提供。以颈-股动脉脉搏传导速度 $> 9 \text{ cm/s}$ 为 AS 筛选指标^[5],患者均为男性,无其他疾病。

1.3.2 血清样本的前处理 清晨空腹状态下采集血液样本,3 000 r/min 离心 10 min,提取 200 μl 血清加入 800 μl 甲醇,涡旋 1 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 200 r/min 离心 5 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。

1.3.3 色谱条件 选用 Water ODS 色谱柱(250.0 mm \times 4.6 mm, 5 μm),柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,流动相 A:甲醇;流动相 B:超纯水(0.1% 甲酸);流动相梯度:0 ~ <5 min, 5% ~ <20% A; 5 ~ <10 min, 20% ~ <35% A; 10 ~ <15 min, 35% ~ <60% A; 15 ~ 20 min, 60% ~ 100% A。流速 0.5 ml/min,进样量为 5 μl 。

1.3.4 液相条件 电离源温度:260 $^{\circ}\text{C}$;干燥气(N_2)流速:10 L/min;雾化器压力:30 psig;裂解电压:160 V;锥孔电压:62 V;质量扫描范围:100 ~ 1 100 m/z。样本测定前运用调谐液对质量轴进

行校正。

1.3.5 质量控制 取所有待测血清样本各 50 μl ,混合后作为质量控制样本(quality control, QC)评价分析方法的稳定性和重复性,每 8 个待测定样本中插入 1 个 QC 样本。在正离子和负离子模式下各选 5 个离子,所选离子如下:正离子模式为 m/z 136.2 681、187.0 638、214.6 059、314.2 274、418.6 837;负离子模式为 m/z 162.5 545、196.6 528、242.5 286、276.4 608、318.5 960。对上述 10 个离子的保留时间、峰面积和质荷比进行统计分析。

1.4 统计学方法

样本运用超高效液相色谱-四极杆飞行时间-质谱(UPLC/Q-TOF-MS)进行检测,得到样本的色谱图,采用 MarkerLynx 软件对所得信息进行提取、背景扣除、峰校准、归一化及数据简化处理,将结果转化为包含化合物保留时间与质荷比信息的 .csv 格式文件。再导入 EZinfo 2.0 软件进行统计分析,并运用偏最小二乘法判别分析法(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析法(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)获得样本分类信息并对潜在生物标志物进行筛选,根据精确分子质量和碎裂离子特征与数据库 HMDB^[6]、LIPID MAPS^[7]及 KEGG^[8]进行匹配比较,通过潜在生物标志物标准品的串联谱图特征再进行对比验证以最终确认。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组一般资料比较

两组年龄、体重指数(BMI)、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)及高密度脂蛋白(HDL)等一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),而动脉波传导速度比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

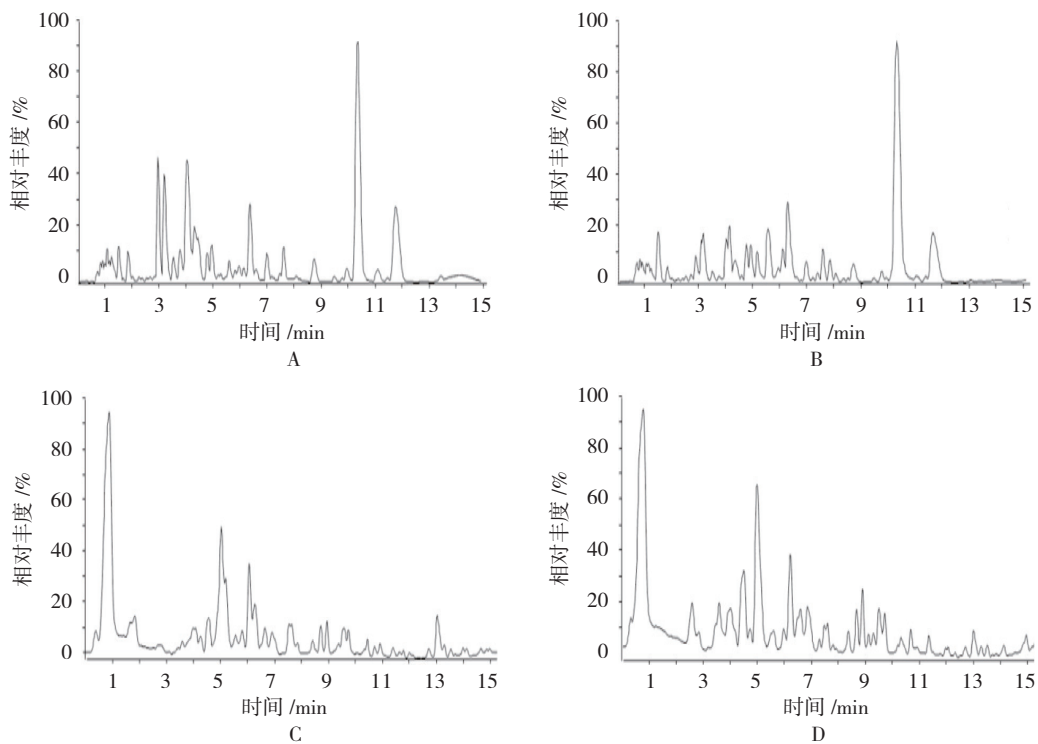
表 1 两组一般资料比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄/岁	BMI/ (kg/m^2)	SBP/mmHg	DBP/mmHg	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	LDL/(mmol/L)	HDL/(mmol/L)	动脉波传导 速度/(m/s)
对照组	24	43.62 \pm 3.42	24.51 \pm 2.16	125.81 \pm 7.29	87.59 \pm 5.27	5.42 \pm 0.71	1.61 \pm 0.26	2.85 \pm 0.38	1.26 \pm 0.33	8.58 \pm 1.14
AS 组	27	44.28 \pm 2.85	23.85 \pm 1.97	127.24 \pm 6.09	88.60 \pm 5.33	5.36 \pm 0.65	1.68 \pm 0.25	2.96 \pm 0.50	1.23 \pm 0.29	9.62 \pm 1.34
t 值		1.025	1.042	1.091	1.086	1.057	1.061	1.013	1.128	2.217
P 值		0.506	0.430	0.334	0.384	0.416	0.405	0.523	0.271	0.021

2.2 UPLC/Q-TOF-MS 方法的血清代谢谱分析

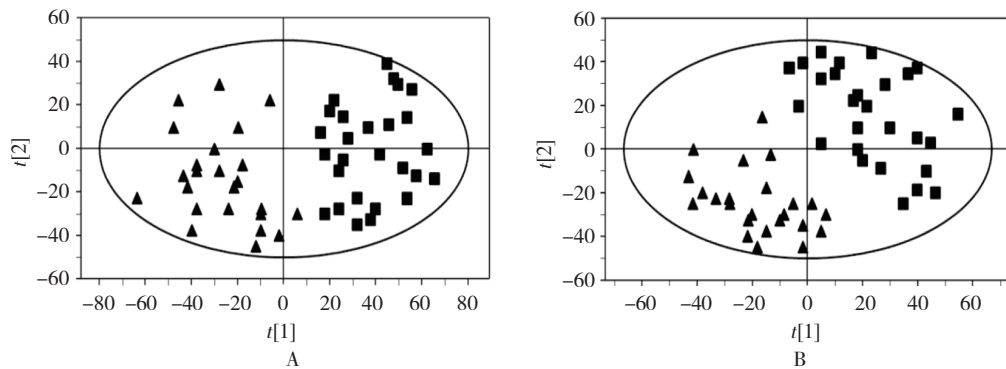
10 个选定离子的保留时间、峰面积及质荷比相对标准偏差分别为 0.17% ~ 0.28%、6.70% ~ 9.60% 及 0.00% ~ 0.07%。结果表明, 本方法分析过程中仪器和试剂的稳定性和重复性良好。正离子和负离子模式下两组典型基峰强度色谱图 (base peak intensity chromatograms, BPI) 中可看出两组间部分峰有差异 (见图 1)。PLS-DA 得分图中每一个标记代表一个样

本, 样本在空间中位置由其化合物的种类和含量所决定, 因此特征相似的样本会距离比较近, 在正离子和负离子模式下, 两组样本分离明显, 表明两组血清代谢轮廓发生改变 (见图 2)。运用 PLS-DA 和 OPLS-DA 法对两组样本进行分析 (评价指标包括 R2X 和 R2Y 值表示模型拟合情况), Q2 值表示模型的预测能力。结果表明, 模型的稳定性和预测率较高。见图 1、2。



A: 对照组正离子模式; B: AS 组正离子模式; C: 对照组负离子模式; D: AS 组负离子模式

图 1 两组患者典型样本 BPI 色谱图



A: 正离子模式; B: 负离子模式; ▲: 对照组样本; ■: AS 组样本

图 2 两组样本 PLS-DA 得分图

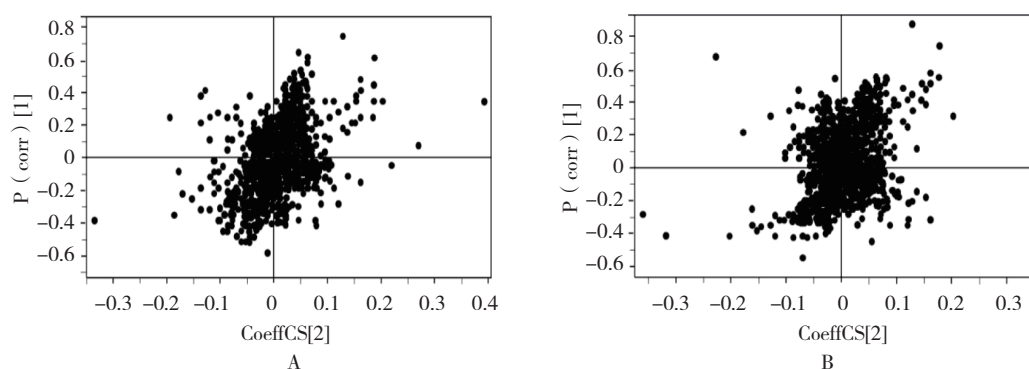
2.3 差异代谢产物鉴定和变化趋势

PLS-DA 载荷图中每一个标记代表一个化合物，距离中心越远的化合物对分组的贡献越大。将 $VIP>1$ 视为差异有统计学意义变量，最终在正离子模式下共鉴定 2 个代谢产物，负离子模式下共鉴定 4 个代谢产物。列举

差异代谢产物信息，与对照组比较，AS 组血清中甜菜碱 ($t=2.164, P=0.027$) 含量升高，而磷脂酰胆碱 ($t=2.073, P=0.038$)、亚油酸 ($t=2.127, P=0.031$)、3-羟基丁酸酯 ($t=2.093, P=0.034$)、柠檬酸 ($t=2.029, P=0.042$) 及赖氨酸 ($t=2.132, P=0.030$) 含量降低。见表 2 和图 3。

表 2 两组血清差异代谢产物鉴定结果

化合物名称	理论分子质量 /Da	测定分子质量 [Da, ($\bar{x} \pm s$)]	相关通路	变化倍数
正离子				
甜菜碱	117.1463	117.1286 \pm 0.0457	氨基酸代谢	0.36
磷脂酰胆碱	758.0603	758.1408 \pm 0.0816	磷脂代谢	0.28
负离子				
亚油酸	280.4455	280.4529 \pm 0.0625	脂肪酸代谢	0.33
3-羟基丁酸酯	104.1045	104.1164 \pm 0.0946	脂肪酸代谢	0.30
柠檬酸	192.1235	192.1170 \pm 0.0347	三羧酸循环	0.25
赖氨酸	146.1876	146.1716 \pm 0.0102	氨基酸代谢	0.34



A: 正离子模式; B: 负离子模式

图 3 两组样本的 OPLS-DA 载荷图

3 讨论

代谢组学研究的目的是疾病诊断或发生发展机制的探讨。AS 研究中，普遍认为脂质代谢紊乱是造成 AS 的重要诱因，有些报道也将极低密度脂蛋白、HDL、LDL、TC 及 TG 等指标作为代谢产物用于 AS 代谢组学的研究^[9-10]。为获得 AS 早期潜在诊断指标，本研究选择 AS 患者时，未将血脂异常患者纳入研究范围，旨在观察血脂未发生异常时体内代谢产物的潜在变化；同时为防止性别、年龄、体重及血压等因素对实验结果的影响，对病例选择进行严格筛选。

氨基酸代谢方面，甜菜碱作为甲硫氨酸循环过程

中甲基的供体参与氨基酸代谢。大量研究表明，甜菜碱与 AS 发生呈正相关，是预测高脂血症和冠状动脉粥样硬化性心脏病的早期生物标志物^[11]。赖氨酸在血浆白蛋白和含有 apoB100 的分子中以糖基化产物或氧化修饰形式存在，血中低水平游离赖氨酸在血脂发生变化时代表氧化应激的发生^[12]。本研究表明，AS 发生早期，血中氨基酸类物质已经产生变化，且预示氧化应激的发生。

柠檬酸作为三羧酸循环的重要中间体，其参与体内脂肪、蛋白质及糖类物质的代谢过程，也是体内能量供应的中间环节。有研究表明柠檬酸和其他参与三羧酸循环的物质与 AS 密切相关^[13]，表明 AS 发生早期

体内三羧酸循环出现紊乱。亚油酸作为一种多不饱和脂肪酸, 是花生四烯酸转化为前列腺素途径的前体物质。有研究表明, 花生四烯酸及其代谢产物前列腺素和白三烯在 AS 和高血压发生过程中密切相关。也有研究报道, 亚油酸在降低血清 TC 和 LDL 水平方面起重要作用^[14]。3-羟基丁酸酯是由乙酰辅酶 A 生成的一种酮体。以往研究认为, 3-羟基丁酸酯的减少意味着高脂血症的发生、发展过程中酮体的积累及乙酰乙酸向丙酮转化的降低, 表明脂肪酸氧化作用的增强^[15]。磷脂酰胆碱是 HDL 中最为主要的脂质, 可通过清除过多 TC 及改善血中胆固醇和脂质的溶解度来影响脂质和胆固醇的沉积; 同时磷脂酰胆碱也是合成极低密度脂蛋白的重要物质, 如果不足则会造成肝脏脂肪的堆积^[16]。

综上所述, 运用基于 UPLC/Q-TOF-MS 技术的代谢组学方法对 AS 男性患者血清代谢谱进行研究, 共鉴定甜菜碱、磷脂酰胆碱、亚油酸、3-羟基丁酸酯、柠檬酸及赖氨酸 6 个差异代谢产物。表明在 AS 发生早期体内氨基酸代谢、脂肪酸代谢、磷脂代谢及三羧酸循环发生了变化, 这些变化有助于了解 AS 的发生、发展过程, 为 AS 早期筛查提供新的参考依据。

参 考 文 献:

- [1] TORRES N, GUEVARA-CRUZ M, VELÁZQUEZ-VILLEGAS L A, et al. Nutrition and atherosclerosis[J]. Arch Med Res, 2015, 46(5): 408-426.
- [2] ALKAN E, KARAKAŞ M S, YILDIRIM B. Evaluation of increased subclinical atherosclerosis risk with carotid intima-media thickness and pulse wave velocity in inflammatory bowel disease[J]. Turk J Gastroenterol, 2014, 25(1): S20-S25.
- [3] POSMA J M, ROBINETTE S L, HOLMES E, et al. Metabonetworks, an interactive matlab-based toolbox for creating, customizing and exploring sub-networks from KEGG[J]. Bioinformatics, 2014, 30(6): 893-895.
- [4] 欧阳昕, 文锦丽, 彭武建, 等. 应用代谢组学方法构建系统性红斑狼疮诊断模型 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(23): 2878-2881.
- [5] 赵志跃, 张志枫, 许家佗. 动脉硬化中西医评估方法的研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(15): 1840-1842.
- [6] HMDB (the human metabolome database). Available online[DB/OL]. <http://www.hmdb.ca/>. Accessed 19 November 2017.
- [7] LIPID MAPS Lipidomics Gateway. Available online[DB/OL]. <http://www.lipidmaps.org/>. Accessed 19 November 2017.
- [8] KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Available online[DB/OL]. <http://www.genome.jp/kegg/>. Accessed 23 November 2017.
- [9] BRINDLE J T, ANTTI H, HOLMES E, et al. Rapid and noninvasive diagnosis of the presence and severity of coronary heart disease using 1H-NMR-based metabolomics[J]. Nat Med, 2002, 8(12): 1439-1444.
- [10] JIANG C Y, YANG K M, YANG L, et al. A 1H NMR based metabolomics approach to progression of coronary atherosclerosis in a hamster model[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2013, 48(4): 495-502.
- [11] BERTRAM H C, LARSEN L B, CHEN X, et al. Impact of high-fat and high-carbohydrate diets on liver metabolism studied in a rat model with a systems biology approach[J]. J Agric Food Chem, 2012, 60(2): 676-684.
- [12] SUN J H, LIU X, CONG L X, et al. Metabolomics study of the therapeutic mechanism of Schisandra Chinensis lignans in diet-induced hyperlipidemia mice[J]. Lipids in Health Dis, 2017, 16(1): 145.
- [13] JIANG C Y, YANG K M, YANG L, et al. A (1)H NMR-based metabolomic investigation of time-related metabolic trajectories of the plasma, urine and liver extracts of hyperlipidemic hamsters[J]. PLoS One, 2012, 8(6): e66786.
- [14] WIJENDRAN V, HAYES K C. Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health[J]. Annu Rev Nutr, 2004, 24(24): 597-615.
- [15] WANG M, WANG F, WANG Y N, et al. Metabolomics study of the therapeutic mechanism of Gynostemma pentaphyllum and atorvastatin for hyperlipidemia in rats[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e78731.
- [16] DUARTE I F, GOODFELLOW B J, BARROS A, et al. Metabolic characterisation of plasma in juveniles with glycogen storage disease type 1a (GSD1a) by high-resolution 1H NMR spectroscopy[J]. NMR Biomed, 2007, 20(4): 401-412.

(唐勇 编辑)